

拮抗放射状菌の堆肥培養について

西 門 義 一・大 島 俊 市・森 田 日 出 男

内 容	
1. 緒 言	5. 論 議
2. 供試材料	6. 摘 要
3. 培養方法	文 献
4. 堆肥培養に関する諸問題	

1. 緒 言

土壌微生物社会の構成並びに現象は極めて複雑微妙であるが、一般に病原微生物に対して、土壌中に拮抗性微生物群が豊富に存在する場合、病菌は土中で急速に死滅に導かれるものである⁽¹⁾⁽²⁾⁽³⁾。土中に潜在する病菌を薬剤によつて殺滅する事が實際上、相当困難な事を考へるならば、拮抗菌を利用する生物学的防除は重要な問題である。この基礎に立つて、従来、種々の研究が行はれたが、應用に至つたものは稀である。これは実験室内の拮抗現象を自然土壌に具現せしめる事の容易ならぬを物語つてゐる。

筆者等は *Bact. solanacearum* に対する放射状菌の拮抗作用について実験し、多数の放射状菌が本病菌に作用するを認めた⁽⁴⁾。これ等拮抗菌株を圃地土壌に繁殖増加させるならば、トマト青枯病（たばこ立枯病）を防除し得るは容易に推察される。而して病圃地に拮抗菌を加へる場合、多くは單に液体又は固体上の純粹培養が供試されて、「拮抗菌の土壌添加形態」について、あまり考慮されていない。筆者は土壌添加に用いる拮抗菌の形態と之に関連した培養についての実験が、此の種の研究に於て重要な部分ではないかと考へる。

本報告は *Bact. solanacearum* に対する拮抗放射状菌の一種を堆肥に大量培養する方法について、実験成績の概要を述べたものである。本研究は主として大島俊市が日本専賣公社岡山たばこ試験場に於て施行した処である。

本研究は文部省科学試験研究費によつたものである。茲に関係当局に深謝する。

2. 供 試 材 料

拮抗放射状菌：*Actinomyces* 1154号株⁽⁵⁾を

供試した。本菌株は *Bact. solanacearum* に対する作用が強く、その性質は比較的判然してゐる。培養生理及び抗菌性について略記すれば次の如くである。

Actinomyces No. 1154, 水に不溶の赤色々素を形成、菌苔は白色、胞子を形成すれば淡灰色を呈する。発育適温 30°C, 最適 pH 7.0, 好適炭素源は甘蔗糖、マンニト等で、窒素源は Casein, Eggalbumin を好む。乾燥に対する抵抗力は、菌苔を乾燥粉末とし、保存した場合、室内では約4ヶ月、デシケーター内では約11ヶ月生存した。死滅温度 65°C 附近、作用範囲は細菌、放射状菌の一部、及び酵母にあり、抗菌物質は菌体及び培養液中に存在し、水、メタノールに易溶、アセトンに不溶、熱に比較的安定で 100°C 1時間 30分処理しても完全には破壊されない。

培 養 材 料

(1) 堆肥：岡山たばこ試験場に常用する落葉堆肥

(2) 燐及び消石灰：市販品

培養材料として堆肥を選んだ理由は、之が耕作者の利用しうる手近な材料として一般的であり、多量に使用し得るものであること、又肥料的にも有意義で、取扱い易いと考へたからである。

3. 培 養 方 法

最初は廣口瓶を用い、常法の如く殺菌して培養を行つたが、勿論、圃場試験に供給するには間に合はない。次には予め堆肥を高圧殺菌し、之を室内に拡げ無菌操作を行ふことなく *Inocula* を添加して攪拌し、箱に詰めて 25°~30°C の定温器に保つた。この方法に依れば定温器の許す範囲内で相当多量の堆肥培養が容易に得られる。其の後の実験に依り、堆肥の殺菌処理は 100°C で充分であり、或程度以上の量を培養すれば、發生する熱で自然に保温される事が明かになつた。以下この培養方法について述べる。

1. 堆肥の前処理

(1) 石灰添加

堆肥中の有機酸を水で溶出し、滴定した実験によれば供試堆肥の pH を中和するに要する消石灰の計算値は 0.01% (重量%以下同じ) であった。之に対し、実際培養試験に於て發育最適の添加量は 1.5~2.0% であった。然し石灰を加へない場合も 3.0% 加へた場合も相当程度發育する。雑菌の侵入や酸性の強い材料を用いる場合を考慮すれば、消石灰は 1.5~2.0% 添加すべきである。

(2) 養分源添加

堆肥中の供試菌に利用可能の炭素源の量は充分でないので旺盛な發育を期待する爲には炭素源を補給する必要がある。炭素源として甘蔗糖を添加した培養成績によると、含水量 50% 堆肥に於て、1.0% 加用区の發育最も良く 3.0% 以上添加した区では發育不良であつた。澱粉を以て甘蔗糖に代へた場合は發育良好で、添加量に比例して發育を増進した。

養分源として麩を用いた結果は極めて良く麩は炭素源として役立つのみならず、供試菌の發育基質となり、豊富な孢子を形成して材料全体を灰白色ならしめる。経済的にも麩が養分源として好適であるので之を 1~2% 添加する。窒素源について硫酸アンモニア及び Peptone を加用した実験によれば添加の効果を認め得なかつた。

(3) 含水量

堆肥の含水量は供試菌の發育、特に孢子形成に影響を及す。実験の結果によれば、含水量 30~50% が最適で、20% 以下では殆んど發育せず、70% 以上では發育が著しく不良となる。即ち多湿は發育に不適当であつて、含水量 50% 又はより乾燥状態が好適である。

(4) 殺菌処理

材料は高圧殺菌の必要なく、100°C で処理すればよい事は前述した。最初は 100°C 1 時間の蒸気処理を行つたが、其後より低温、短時間処理で充分であることを認めた。

処理温度の最低限界について実験した結果によれば材料温度が 90°C 以上に達すれば完全であり、60°C 以下では發育不良で雑菌 (*Mucor* sp.) が発生した。

2. Inocula の添加

堆肥培養に用いる Inocula は斜面培養、液体培養は不適当で、予め堆肥に培養したものを使用する。Inocula は新鮮なもの程良い事は明であるが一般に *Actinomyces* は乾燥に抵抗力強く、良く保存に耐へる。供試菌孢子は乾燥状態に於ける生存期間が、室内で 164 日であつた。之は全孢子の死滅に要した日数であつて、大部分の孢子が生きてゐる期間は約 4 ヶ月であつた。デシケーター中に保存した場合は室内より 2~3 倍長く生存する。普通堆肥に於ける生存期間は其の保湿状態、温度等によつて異なるが、廣口瓶に綿栓して保存した場合、6 ヶ月以上で環境条件の不適当な場合は 4~5 ヶ月で活力減退を認めた。

前処理を終つた堆肥は 50°C 以下に冷却するを待つて Inocula を添加し攪拌する。添加量は 5.0% を基準としたが其後の実験から極めて少量でよい事を知つた。

即ち Inocula 添加率は 0.01% 迄は同程度の發育を認め、それ以下では Colony の発現が遅れるが發育程度に差がない。添加の最少限を知る爲に添加率を漸減して培養したが、依然として發育程度に差を生じないので実験は 0.001% で打切つた。[添加率の最低限はより少い所にある様である。0.001% と謂へば 1 噸当り Inocula 1 g であり、実験的には、殺菌土壌で Inocula を萬増稀釈して供試した。この結果から Inocula の量は極めて少量で足る事を知つた。

Inocula 添加後は攪拌して孢子の均等な分布を計らねばならない。Inocula の量が少い場合は特に攪拌混和が必要である。

添加操作は無菌的に行ふ必要はなく、開放で実施してよい。

3. 培養管理

培養管理の要点は温度操作である。供試菌の發育温度範囲は 15~40°C であつて、堆肥をその限界内の温度に保てばよい。最適温度は 30°C であるが、大量培養の場合は発熱して温度は自然に上昇する。発熱の爲に温度が 60°C 以上に達すると供試菌が死滅する危険がある。

堆肥 25kg に培養してその発熱を測定した結果は第 I 表の如くである。

第 1 表 Actinomyces No. 1154 の堆肥培養に於ける発熱

経過時間	接種時	6	12	18	24	30	36	42	48	54	60	66	72	78	84	90	96	120	148
外 温	17	7	5	10	16	10	6	7	9	8	6.5	6.5	13	11	9	8	17	13	14
堆 肥 温 度	35	33	34	36	39	38	37	34	30	19	23	21	19	18	18	17	17	16	14

(註) 堆肥25kg使用、実験期間 昭和25年11月14日—11月20日

即ち初温 35°C の場合、温度は最初漸次下降するが、経過時間10時間頃より昇温が認められ、24時間で最高に達し、40時間位から徐々に下降し、100時間では気温と大差なく接種後5日で発熱は全く認められなくなる。

従つて温度操作の要点は、接種後約10時間発育温度に保つ事であつて、其後は発熱によつて自然に保温せられる。一度昇温した後、温度の下降が認められる頃には放射状菌は大体発育し終つて、堆肥は白粉状を呈してゐる。接種後2日でこの状態となり通常5日間で完全に発育し終る。因に廣口瓶で常法に従い無菌培養した場合完全発育までに10~20日を要する。

放射状菌の繁殖活度は発熱カーブと全く平行的であつて堆肥温度の測定によつて明確に観測することが出来る。筆者等は隔測自記寒暖計を利用して好結果を得てゐる。

培養中の雑菌の問題は、余り考慮する必要はない様である。材料は完全殺菌しないので、勿論他の微生物、特に芽胞菌の存在する事は明であるが、供試菌の発育が迅速であり、抗細菌性である爲に、初発育に於て優先すれば他菌の発生を許さない様である。

4. 堆肥培養に関する諸問題

拮抗放射状菌を堆肥に培養する方法は元來、耕作者によつて行はれ得る事を理想とする。前項に述べた方法を耕作者が行ふ場合、最も難点と思はれるのは加熱殺菌操作である。若し、殺菌処理を行はず、生堆肥に直接 Inocula を添加し、培養し得るならば甚だ便利である。筆者等はこの生堆肥培養の可否をめぐる種々の問題を取扱つた。

(1) 無殺菌堆肥に培養した場合

堆肥培養操作中、殺菌のみを省略した場合は添加した麩粒には旺盛に発育するが、堆肥材料には発育し難い。含水量を少くし、石灰の量を

少々多くした場合は僅に発育良好であつた。

生堆肥に発育し難い原因として次の如き事項を想定した。

- (a) 石灰による酸性中和が充分に行はれない事
- (b) 加熱による材料の栄養条件の好轉が無い事
- (c) 堆肥中の先住微生物の作用。
- (d) 先住微生物の生産した抗性物質の存在。
- (e) 其他未知の原因。

(a) の石灰による酸性中和の問題は、原因としない事が明かにせられた。即ち、加熱殺菌を行へば、予め石灰を添加したもの、殺菌後に石灰を添加したもの同様に良好な発育を示した。又 (b) 栄養条件の好轉もその原因となり得ない事が次の実験によつて証明せられた。

(2) Chloropicrin 処理による生堆肥培養試験

実験方法：生堆肥に常法の如く前処理を行ひ（但し加熱殺菌を行はない）密閉器内で Chloropicrin 瓦斯に曝す。24時間後取出して抜けて瓦斯を除き之に供試菌を接種し、30°C に保つた。

結果及び考察：加熱殺菌を行つたものと同様、発育極めて良好であつた。この結果から考察するに、生堆肥に発育し難い原因は Chloropicrin 処理によつて除かれたものの様であり、Chloropicrin の殺菌作用が関與して奏効したものと言ひ得る。この事から原因は堆肥中の先住微生物に在り、之が大部分死滅した爲に供試菌が良好な発育をしたものである。

堆肥中の如何なる種類の微生物が放射状菌の発育阻害作用に関係が深いのか、或は微生物の量そのものが作用となる所謂 Mass Action であるかは未だ明かでない。堆肥中に或種の抗菌物質が存在することも考へられるが確かでない。要之生堆肥に放射状菌を培養する場合には先住微生物の活力を削減しなければならないが、その全部を殺滅する必要は無く、90°C (沸熱) の

加熱或は Chloropicrin 処理で充分目的を達し得る。

(3) Colony 消失現象

生堆肥に培養した場合、黴粒に形成された Colony が白点となつて観察されるが、この白点状 Colony は培養中、漸次消失して、5~10 日で全く認められなくなる。この現象を我々は Colony 消失現象と呼ぶ。この現象は明かに、供試拮抗放射状菌の拮抗作用をうけない微生物の働きによるものである。消失しはじめた黴粒から一種の細菌を分離し得たが、本菌のみがこの現象の原因であると断言出来ない。

Colony 消失現象は生堆肥培養に特有のもので加熱殺菌又は Chloropicrin 処理を行つた場合は現れず、二硫化炭素、青酸ガス等で処理した場合は発現し難い。

(4) 生堆肥培養に於る添加剤と放射状菌の発育との関係

堆肥中の先住微生物に有害で、拮抗菌に無害である薬剤、或は供試拮抗菌の発育のみを促進する添加剤を利用すれば、殺菌処理を行はずして拮抗菌を繁殖せしめる事が可能ではないか。

この企図のもとに堆肥に各種薬剤を少量添加し、培養試験を行い、次の結果を得た。

(a) 生堆肥 100g に数滴のベンゾール、石油ベンジン機械油及び DDT 乳剤（ベンゾールを含む、使用量は 100 倍液 10cc）を添加した場合は発良好で Colony 消失現象が起り難い。

(b) ウスブルン 1 万倍液、硫酸銅 5000 倍液、明礬 1000 倍液を堆肥 1 kg に 200cc 加へた区は標準区より良好な発育を認めたが、Colony 消失現象が現れた。

(c) 昇汞 5000~10000 倍液区では放射状菌は殆んど発育せず、黴 (Mucor etc.) の発生が著しい。ウスブルン 3000 倍液区、硫酸亜鉛区は発育不良であつた。

実験の範囲ではベンゾール及び DDT 乳剤の添加が最も好成績であつた。ベンゾールが土壌中の放射状菌群の繁殖を促進することは文献にみられるが⁽⁹⁾之が刺激剤として効くか、他の微生物に有害に作用するかは明かでない。

各種土壌菌をベンゾールの蒸気の影響下に培養した実験によると、ベンゾールは各種微生物特に細菌類の発育を阻害する。

供試した殺菌剤は先住微生物の圧迫に役立つ様であるが、同時に供試菌にも有害であつて、利用し得ない。

5. 論 議

堆肥培養の使命は、拮抗菌を実験室から圃地へ移す場合の適当な Carrier となる事である。拮抗放射状菌を堆肥に培養する事は、實際上からも妥当と考へられたが、一見簡単にみえる堆肥培養法が意外に難問題で、本実験で、堆肥を通じて拮抗菌と他の微生物との相互関係や環境条件の影響等の一端をうかがひ得た堆肥にて得られた諸知識は、次の段階である土壌中の拮抗菌の動静を探索する上に有意義であらう。

殺菌堆肥に対する Inocula の添加率は堆肥重の 0.001 % 以下の僅かで充分である。この事は拮抗菌に好適な条件さへ與へられるならば、之に添加する菌の量は僅少で足りる事を意味する。換言すれば、拮抗菌を繁殖させる場合には材料に添加する拮抗菌の量よりも、その環境条件の適否が極めて重要な事を示すものである。

生堆肥に培養する場合、前処理として先住微生物を或程度死滅又は抑圧する事が必要である。而して必ずしも完全殺菌を要しない。この事實は、先住微生物の活力乃至生理学的圧力を減退せしめる事が、自然環境に於て一種の菌が優位を占める前提として必須条件である事を示唆するものではないか。而して打開した Microflora の空隙に拮抗菌が充満すれば、ここに病菌に対して Microflora の Stability が確定されるものと考へられる。

放射状菌の発育と環境条件との関係は多湿は常に発育に不適當であつて、50% 内外の含水量が最適であつた。之は放射状菌類が一般に、比較的乾燥地の土壌に多く存在し、多湿地や排水不良土に少い事実と符合する様である。

消石灰添加の効果は殺菌堆肥に於ては、あまり現れないが、無殺菌堆肥では明かである。即ち消石灰の効果は放射状菌が他の微生物と混在する場合に著しい。

添加剤の微生物発育に対する影響は注目すべきものがある。ベンゾール、石油ベンジン等は供試放射状菌の発育を著しく促進し、ベンゾールを溶媒に含む DDT 乳剤も同様の作用を示し

た。生堆肥に 5000~10000 倍昇永水を添加した場合放射状菌は全く発育せず微類の発生が顕著であつた。この事から特定の添加剤を用いて、土壌の Microflora を変化させ、特定の微生物群を選択的に繁殖させ得ることが推論される。農薬等が土壌に與へられた場合 Microflora に予期せざる変化を起し、之が間接に病害発生等に影響する場合が起り得ると考へられる。

以上は堆肥と謂ふ特殊基質に於ける現象から推論したものであつて拮抗菌と微生物間の複雑な関係は、今後の研究によつて究明せられるべき問題である。

6. 摘 要

1. 本報告は *Bact. solanacearum* に対する拮抗放射状菌 No. 1154 を堆肥に大量培養して圃場試験の供試材料を作つた実験の概要である。

2. 堆肥に消石灰 1.5~2.0 % (重量%以下同様)、麩 1~2 % を加へ、含水量を 50 % 内外とし、90°C 以上の加熱又は *Chloropicrin* 消毒を行い、之に供試菌を少量接種して充分攪拌し、10~12 時間 25~30°C に保てば放射状菌は発育を始め、発熱し、5~7 日間で完全に発育する。

3. 生堆肥 (殺菌処理しないもの) に培養した場合は発育不良で Colony 消失現象が起る。その原因は先住微生物の存在によるもので、その活力を減退せしめ、Microflora の Stability を破壊して後、供試菌を接種しなければならぬ。

4. 生堆肥に於ても含水量を少くし、石灰及び麩を増量し、少量のベンゼン、石油ベンゼン、DDT 乳剤等の発育促進剤を添加して培養すれば可成の発育をなし得る。

参 考 文 献

- (1) 日野巖：土壌プロトゾアに関する研究，III. 土壌及び水中に於ける植物病原菌の絶滅に関する研究．農学会報 No. 289. P. 523—528. 1926
- (2) 日野巖：柑橘潰瘍病菌の土壌中及び水中に於ける運命．柑橘研究 Vol. 4. No. 2. P. 167—178, 1931
- (3) 板野新夫：土壌微生物学 P. 336, 1931
- (4) 中田覺五郎：烟草立枯病の予防驅除方針について、農学会報 No. 298. P. 389—411. 1927
- (5) 西門義一他：拮抗微生物利用による作物病害防除の研究 第 1 報 トマト青枯病菌 *Bact. solanacearum* に對し拮抗作用を有する放射状菌に就て．農学研究 Vol. 38. No. 2. P. 6. 1949